

氏名（本籍）	<small>たかはし まさき</small> 高橋 正樹（東京都）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	博第 303 号
学位授与の日付	令和 2 年 3 月 19 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	クレアチンおよびその代謝物の促進拡散に関与するトランスポーターの機能同定に関する研究
論文審査委員	（主査）教授 井上 勝央 教授 藤原 泰之 教授 市田 公美

論文内容の要旨

医薬品が適正に薬効を発揮するためには、有効成分である薬物を必要量、標的部位に送達させることが重要である。一般に、経口投与された薬物は、吸収および分布過程を経て標的臓器に到達するが、その際の薬物の吸収性および分布性は個々の薬物により大きく異なり、その特性には細胞膜透過性が関与する。一般に、薬物の生体膜透過過程は、薬物の物理化学的性質に基づく単純拡散と輸送担体（トランスポーター）を介する特殊輸送に大別される。単純拡散は、細胞膜内外の濃度勾配に基づく拡散現象であり、薬物自体の物理化学的性質に大きく依存する。一方、トランスポーターを介する特殊輸送は、ATP の加水分解エネルギーを直接利用し、薬物の細胞外排出に関与するトランスポーター群（ATP-binding cassette (ABC) transporters）と種々のイオン濃度勾配や化合物との共輸送、交換輸送および促進拡散を担うトランスポーター群（solute carrier (SLC) transporters）に大別される。ABC トランスポーターは、多剤耐性に関わる重要なトランスポーターが含まれ、これまでに詳細な検討が行われている。一方、SLC トランスポーターは、その機能から濃縮型トランスポーターと促進拡散型トランスポーターに分類される。濃縮型トランスポーターは、輸送機能が明確であるため、ABC トランスポーターと同様に様々な解析がなされている一方、促進拡散型トランスポーターは、ATP の加水分解エネルギーや Na^+ 、 H^+ などの濃度勾配を駆動力とせず、基質自体の電気化学ポテンシャル勾配に基づき輸送を行うことが知られているが、一部を除き、基質や機能などを含め未解明な部分が多く、輸送活性の解析方法にも乏しいのが現状である。さらに、促進拡散型トランスポーターを介した薬物輸送に関する報告は少なく、その医薬品の体内動態に与える影響も明らかとなっていない。

そこで促進拡散型トランスポーターに着目し、その医薬品の体内動態に与える影響

を明らかとするため、促進拡散を行う分子実体の同定及びその解析法の開発を目的とし、本研究では促進拡散型トランスポーターの関与が想定される内因性化合物の生体膜透過に関わるトランスポーターの機能同定に関する検討を行った。また本検討では、膜電位による輸送現象の影響を除外するために、電気化学的に中性な内因性物質である creatine および creatinine を被験化合物として選定した。

第1章 Creatine に対する促進拡散型トランスポーターとしての SLC16A12/MCT12 の機能同定

Creatine は生体内において、腎臓、肝臓を経て生合成され、血流を経て骨格筋や心筋へ取り込まれ、高エネルギーリン酸結合体の phosphocreatine となることで ATP のエネルギー保存に関与する。creatine は、その分子構造中にカルボキシル基およびグアニジド基を有し、生体内 pH において双性イオンの状態で存在するため、単純拡散による生体膜透過性は極めて小さく、その膜透過にはトランスポーターの関与が必須である。Creatine の骨格筋への取り込みに関わるトランスポーターとして、Na⁺および Cl⁻濃度勾配依存的に creatine を輸送する SLC6A8 (CRT1: creatine transporter 1) が古くから知られている一方、近年、新たな creatine トランスポーターとして SLC16A12 (MCT12: monocarboxylate transporter 12) が同定されている。MCT12 は、Na⁺、Cl⁻非依存的な輸送特性を示し、また H⁺依存性モノカルボン酸トランスポーターである MCT1-4 とは異なり、高 pH で輸送活性の増強が認められており、MCT12 による creatine 輸送の詳細なメカニズムは不明である。

そこで本研究では、MCT12 が creatine 輸送を行う促進拡散型トランスポーターであると仮説を立て、哺乳類培養細胞系における MCT12 の creatine 輸送を評価し、その輸送機構を検討した。

哺乳類培養細胞系における MCT12 の creatine 輸送活性を確認するため、ヒト胎児腎由来細胞である HEK293 細胞を用い、MCT12 および MCT12 と分子シャペロンを形成し、MCT12 の細胞膜安定性を向上させると報告されている CD147 を一過性に発現させ、[¹⁴C]creatine の取り込みを評価した。[¹⁴C]creatine の取り込みは、CRT1 発現細胞において、顕著な増加が認められた一方、MCT12 単独発現および MCT12、CD147 共発現細胞においては有意な活性変動は認められなかった (Fig. 1)。この結果は、先のアフリカツメガエル卵母細胞発現系における MCT12 の creatine 輸送活性の報告と矛盾するものであった。

一般に、SLC タイプのトランスポーターは生体膜を隔てた双方向への輸送能を有し、

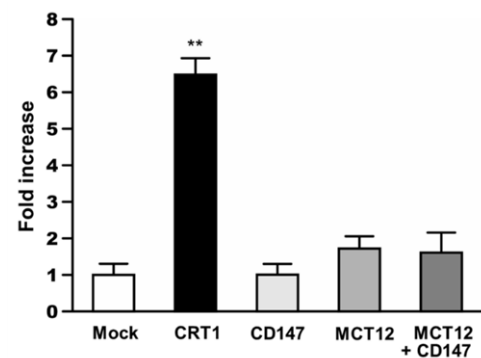


Fig. 1. The uptake of creatine in HEK293 cells transiently expressing CRT1, MCT12 with, or without CD147.

その多くは基質あるいは共輸送するイオンの濃度勾配に対応して輸送方向が決定される。しかし、CRT1 による creatine 輸送においては、細胞外の Na^+ および Cl^- 濃度勾配を利用して細胞内に creatine を取り込ませた後、細胞外の Na^+ を除去しても、細胞内から細胞外への逆方法への輸送は起きないことが報告されている。そこで、この特異的な CRT1 の輸送機能を応用し、MCT12 の creatine 排出活性を評価した。

すなわち、CRT1 により細胞内へ ^{14}C creatine をプレロードした後、細胞外を NaCl を含まない uptake buffer (efflux buffer) に置換した後、既定時間インキュベーションを行った後の細胞内 ^{14}C creatine 残存率を評価した。CRT1 単独発現および CRT1 + CD147 共発現細胞において、 ^{14}C creatine の細胞内残存率は 10 分間のインキュベーションにより約 71% に低下したが、その値は

それ以降 60 分まではほぼ一定に維持された。一方、CRT1 + MCT12 共発現細胞および CRT1 + MCT12 + CD147 共発現細胞における ^{14}C creatine 細胞内残存率は、時間依存的に減少し、60 分経過後には 5% 未満に低下した (Fig. 2)。また、プレロードした後の細胞内 ^{14}C creatine 初期濃度は、CRT1 単独発現細胞と比較し、MCT12 共発現細胞において約 76% に低下することが示された。また、この細胞外への排出は細胞外

pH、 Na^+ や Cl^- に依存しないことが示された。このような ^{14}C creatine 排出活性は、MCT12 と構造的類似性を有する MCT1 では認められず、MCT12 特異的な輸送現象であることが示唆された。部位特異的変異法による輸送解析より、MCT12 による creatine 輸送活性には、TMD (transmembrane domain) に存在する 65 番目と 299 番目の Asp および

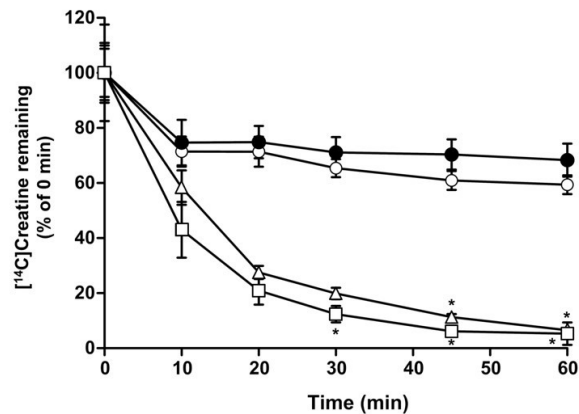


Fig. 2. The efflux of creatine from HEK293 cells transiently expressing CRT1 and MCT12. Time course profiles of intracellular ^{14}C creatine levels in HEK293 cells transiently expressing CRT1 alone (open circle), CRT1 and CD147 (closed circle), CRT1 and MCT12 (open triangle), and CRT1 and MCT12 with CD147 (open square) after replacing the uptake buffer for the efflux buffer. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared with the value for residual ^{14}C creatine (% of 0 min) in HEK293 cells expressing CRT1 alone.

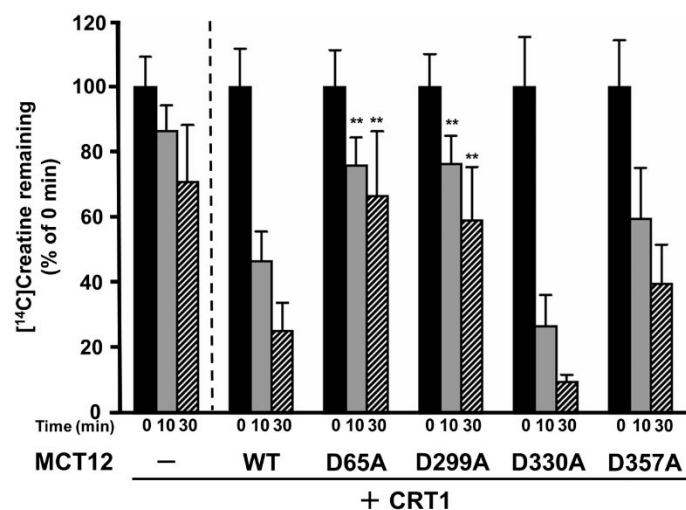


Fig. 3. Effect of amino acid substitution in the transmembrane domains (TMD) of MCT12 in MCT12-mediated creatine efflux in HEK293 cells. ** $p < 0.01$, compared with the value for HEK293/MCT12 wild type cells.

37 番目の Arg が関与することが示唆された (Fig. 3)。MCT12 および CD147 の mRNA はヒト腎臓において発現が認められ、MDCKII 細胞に発現した GFP-MCT12 は CD147 との共発現により側底膜に局在したことから、MCT12 は腎臓において細胞内 creatine の血液側への排出に関与していると推測された。

以上より、MCT12 による creatine の輸送機構は促進拡散であることが示唆された。また、濃縮型トランスポーターと促進拡散型トランスポーターを共発現させる本手法は、促進拡散型トランスポーターの機能同定に有用であることが示された。

第 2 章 Creatinine の生体膜透過に与えるトランスポーターの影響

Creatinine は、creatine の最終代謝産物であり、主として骨格筋で creatine および phosphocreatine から非酵素的に産生され、臨床において血清 creatinine 値は腎機能マーカーとして汎用されている。近年、Creatinine は、各種トランスポーター (OCT2、OAT2、MATE1 および MATE2-K) の基質であり、腎臓において尿細管分泌を受けることが明らかとなったことから、骨格筋内で産生された creatinine の血液への移行においてもトランスポーターの関与が想定されるが、骨格筋では上述の creatinine を輸送するトランスポーターの発現はほとんど認められず、また、筋細胞や骨格筋組織における creatinine の輸送現象自体は検出されていないため、骨格筋における細胞外へ creatinine の排出に関わる分子機構は不明である。

そこで、前章で確立した排出輸送の評価方法を応用し、促進拡散型 creatinine トランスポーターの探索を行った。細胞内へ creatinine を濃縮的に取り込ませるトランスポーターとして OAT2 を選択し、各種トランスポーターを共発現した細胞における creatinine 排出活性を評価した。

OAT2 による $[^3\text{H}]\text{cGMP}$ の取り込み活性は、検討した各種トランスポーターとの共発現により有意な影響を受けなかったが、同条件で $[^{14}\text{C}]\text{creatinine}$ の取り込みを顕著に低下させるトランスポーターを 2 種同定した (creatinine transporter 1 : CreT1 および creatinine transporter 2 : CreT2)。CreT1 および CreT2 共発現細胞における $[^3\text{H}]\text{cGMP}$ と $[^{14}\text{C}]\text{creatinine}$ の取り込み比は阻害剤存在下において顕著に増加し、OAT2 単独発現細胞と同等のレベルまで回復した。本結果は、CreT1 および CreT2 が creatinine を輸送基質とする促進拡散型トランスポーターであることを示唆するものである。また、CreT1 は骨格筋にも発現していることから、骨格筋から血液中へ creatinine を排出に関与していることが示唆された。

以上、本研究の成果より、前章で提唱した、濃縮型トランスポーターの機能を利用し、細胞内から細胞外に基質の濃度勾配を形成させ、促進拡散型トランスポーターを共発現させることで基質を細胞外へ排出させたのちの細胞内残存率を測定する手法が、促進拡散型トランスポーターの機能評価に応用できることを示した。今後、現在までに機能が明らかとなっていない促進拡散型トランスポーターの同定および評価に応用できるものと期待される。

【研究結果の掲載誌】 *Drug Metab Pharmacokinet.*2020. doi: 10.1016/j.dmpk.2020.01.008.

論文審査の結果の要旨

本申請論文は、クレアチンおよびその代謝物であるクレアチニンを細胞内に濃縮的に取り込むトランスポーターを利用して、それら化合物を基質とする促進拡散型トランスポーターの機能特性について検討し、その研究成果をまとめたものである。

トランスポーターは、細胞膜を隔てた様々な物質の輸送を媒介し、生体の恒常性維持において重要な役割を担うことが知られているが、最近では、薬物の体内動態における重要性も示されている。そのため、薬物治療の最適化や効率的な医薬品開発の推進の観点からトランスポーターの機能に関する様々な検討がなされてきており、特に、基質の濃度勾配あるいは電気化学的勾配に逆らう能動輸送を行うトランスポーターに関しては、基質の輸送現象が明確に観察されるため、様々な解析が行われている。一方、基質の濃度勾配を駆動力とする促進拡散型トランスポーターに関しては、基質や輸送特性に関して未解明の部分が多く、輸送解析の手法にも乏しいため、薬物の体内動態における促進拡散の関与および寄与は不明である。そのような背景のもと、申請者は、促進拡散型トランスポーターの特性を明らかにするために、促進拡散の関与が想定される内因性化合物としてクレアチンおよびクレアチニンを選択し、それら化合物のトランスポーター介在性の細胞膜透過過程について検討し、以下のような促進拡散に関する新たな知見を 2 章にまとめている。

第 1 章では、アフリカツメガエル卵母細胞発現系における輸送解析からクレアチントランスポーターとして同定されている SLC16A12/MCT12 について、哺乳類細胞発現系におけるクレアチン輸送とその評価法を検討し、常法の取り込み試験による MCT12 の輸送評価が困難であることを示すと共に、濃縮型トランスポーターを利用して細胞内にクレアチンを蓄積することで MCT12 を介した排出輸送を明確に測定できることを述べている。申請者は、Na⁺、Cl⁻依存性クレアチントランスポーターである SLC6A8/CRT1 が、NaCl および細胞外クレアチン非存在下において、細胞内に取り込んだクレアチンを細胞外に排出しないユニークな輸送特性を有することに着目し、CRT1 および MCT12 を共発現させた HEK293 細胞にクレアチンをプレロードし、NaCl 非存在下における排出輸送を検討した結果、時間依存的な顕著な排出輸送が認められ、その活性は pH の影響を受けないことを見出した。この排出輸送活性が MCT12 に起因することを部位特異的変異法により直接的に証明し、ヒト MCT12 の膜貫通領域に存在する Arg37、Asp65 および D299 の重要性を示している。このような輸送特性に基づき、申請者は MCT12 がクレアチンの促進拡散を行うトランスポーターであると結論づけるとともに、促進拡散型トランスポーターの評価において、濃縮型トランスポーターの機能を利用した排出輸送の評価が有用であると考察している。

第 2 章では、クレアチンの代謝物であるクレアチニンの細胞膜透過過程における促進拡散型トランスポーターの関与を想定し、クレアチニンの濃縮型トランスポーターを活用したクレアチニン排出輸送活性のスクリーニング評価を行い、新規クレアチントランスポーターとして SLC29A2/ENT2 および SLC43A3/ENBT1 を同定すると共に、その輸送特性と生理的意義について述べている。申請者は、第 1 章で得られた知見に基づき、クレアチニンを細胞内に濃縮的に集積させるトランスポーターとして SLC22A6/OAT2 を用い、各種トランスポーターとの共発現系

におけるクレアチニンと OAT2 の特異的基質である cGMP の定常状態における細胞内残存量を検討した結果、ENT2 および ENBT1 の共発現により、クレアチニン/cGMP の細胞内残存量比が顕著に低下することを見出した。その残存量比の低下は、それぞれのトランスポーターの特異的阻害剤添加により、コントロールレベルにまで回復することから、ENT2 および ENBT1 によるクレアチニン排出輸送活性が示された。さらに、それぞれの単独発現系ではクレアチニンの有意な細胞内取り込みが認められないことから、上述の結果と併せて、ENT2 および ENBT1 は新規の促進拡散型クレアチニントランスポーターであると結論づけ、それぞれの生理的役割は、筋肉および血管内皮細胞におけるクレアチニン輸送に関与すると考察している。

以上の研究成果は、促進拡散型トランスポーターの特性やこれらトランスポーターにより輸送される化合物の体内動態を理解するための分子基盤となると共に、有用な促進拡散の評価法を提供するものである。今後、促進拡散型トランスポーターを介した薬物の体内動態や薬物間相互作用の分子機構の解明、体内動態の把握に基づく医薬品の開発に繋がるものと期待される。よって、本論文は、博士（薬学）の学位論文として十分な価値を有するものと認める。